

THESIS

BONN

1969

MODELLVERSUCHE ZUR DARSTELLUNG DER WACHSTUMS-
KONKURRENZ ZWISCHEN AEROMONAS HYDROPHILA UND
EINIGEN ENTEROBACTERIACEEN IM HÄUSLICHEN ABWASSER

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

vorgelegt von

Doris Dyckmans

aus Köln

Bonn 1969

MODELLVERSUCHE ZUR DARSTELLUNG DER WACHSTUMS-
KONKURRENZ ZWISCHEN AEROMONAS HYDROPHILA UND
EINIGEN ENTEROBACTERIACEEN IM HÄUSLICHEN ABWASSER

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

vorgelegt von

Doris Dyckmans

aus Köln

Bonn 1969

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

Referent: Priv. Doz. Dr. med. R.H.W. Schubert
Korreferent: Prof. Dr. med. H. Habs

Tag der mündlichen Prüfung: 18.6.69

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Bonn
Direktor: Professor Dr. med. H. Habs

Druck: R. Schwarzbild, 5301 Witterschlick, Geltorfstr. 52

Meiner Mutter und meinem verstorbenen Vater



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153520_0095

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
1.00 Literaturverzeichnis	5
2.00 Einleitung	6
3.00 Material	9
3.10 Bakterienstämme	9
3.20 Rezepte	10
4.00 Versuchstechnik	11
4.10 Herstellung der Bakteriensuspensionen	11
4.20 Ermittlung der Zahl der koloniebildenden Einheiten	12
4.30 Ansatz der Modellversuche zur Wachstumskonkurrenz	12
5.00 Ergebnisse der Modellversuche	14
5.10 Wachstumsgeschwindigkeit der Versuchsstämme bei 15°C und 10°C	14
5.20 Beschreibung der Konkurrenzversuche	21
5.21 Konkurrenzversuche zwischen <i>Aeromonas hydrophila</i> C ₁ und den untersuchten Enterobacteriaceen	21
5.2111 Wachstumskonkurrenz zwischen <i>Aeromonas hydrophila</i> C ₁ und <i>Escherichia coli</i> 67/VI bei 15°C	21

5.2112	Wachstumskonkurrenz zwischen <i>Aeromonas hydrophila</i> C ₁ und <i>Escherichia coli</i> 67/VI bei 10°C	23
5.2121	Wachstumskonkurrenz zwischen <i>Aeromonas hydrophila</i> C ₁ und <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 11439 bei 15°C	26
5.2122	Wachstumskonkurrenz zwischen <i>Aeromonas hydrophila</i> C ₁ und <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 11439 bei 10°C	29
5.2131	Wachstumskonkurrenz zwischen <i>Aeromonas hydrophila</i> C ₁ und <i>Citrobacter freundii</i> RT 1/2 bei 15°C	30
5.2132	Wachstumskonkurrenz zwischen <i>Aeromonas hydrophila</i> C ₁ und <i>Citrobacter freundii</i> RT 1/2 bei 10°C	30
5.22	Konkurrenzversuche zwischen <i>Aeromonas hydrophila</i> 43 und <i>E. coli</i> 67/VI bzw. <i>Citrobacter freundii</i> RT 1/2	34
5.2211	Wachstumskonkurrenz zwischen <i>Aeromonas hydrophila</i> 43 und <i>Escherichia coli</i> 67/VI bei 15°C	35
5.2212	Wachstumskonkurrenz zwischen <i>Aeromonas hydrophila</i> 43 und <i>Escherichia coli</i> 67/VI bei 10°C	36
5.2221	Wachstumskonkurrenz zwischen <i>Aeromonas hydrophila</i> 43 und <i>Citrobacter freundii</i> RT 1/2 bei 15°C	39
5.2222	Wachstumskonkurrenz zwischen <i>Aeromonas hydrophila</i> 43 und <i>Citrobacter freundii</i> RT 1/2 bei 10°C	41
6.00	Diskussion	45
7.00	Zusammenfassung	48

1.00 Literaturverzeichnis

- Caseltitz, F.H.: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Band XVI/10 (1966)
- Habs, H. und Langeloh, U.: Arch.Hyg.Bakt. 144, 277 - 286 (1960)
- Joó, S.: Dissertation, Bonn 1965
- Kruse, W.: Die Mikroorganismen p. 315 (1896)
- Kulp, W.L. und Borden, D.G.: J.Bact. 44, 673 (1942)
- Martinstetter, P.: Dissertation, Bonn 1967
- Schubert, R.H.W.: Zbl.Bakt.I.Orig. 147, 178 - 188
(1963)
- Schubert, R.H.W.: Arch.Hyg. 150, 709 (1967a)
- Schubert, R.H.W.: Arch.Hyg. 150, 689 (1967b)
- Zimmermann, O.E.R.: Elfter Bericht der Naturwissenschaftlichen Gesellschaft zu Chemnitz p. 86 (1890)

2.00 Einleitung

Taxonomische Untersuchungen haben in den letzten zehn Jahren gezeigt, daß eine Gruppe von Bakterienarten der Gattung *Aeromonas* zugeordnet werden kann, die bis dahin unter den verschiedensten Namen als Erreger von Krankheiten bei Wechselblütern und einigen Warmblütern bekannt war. Neben dem systematischen und differentialdiagnostischen Interesse wurde den *Aeromonaden* in der letzten Zeit auch deshalb erhöhte Aufmerksamkeit geschenkt, weil Infektionen beim Menschen beobachtet werden konnten (Caselitz 1966, Schubert 1967a).

Obwohl das Vorkommen dieser Bakterien in der Umwelt - insbesondere in Oberflächengewässern - bereits in der älteren Literatur beschrieben wurde, ist die Oekologie dieser Bakteriengruppe erst relativ spät wissenschaftlich bearbeitet worden. Dabei hat sich gezeigt, daß die Befunde von Zimmermann (1890) und Kruse (1896) mit den neueren Erkenntnissen über die Verbreitung der *Aeromonaden* in oberirdischen Gewässern in Einklang stehen. Zimmermann fand den *Bacillus punctatus* "häufig im Wasser der Chemnitzer Wasserleitung, auch in der Döbelner" und Kruse schrieb, daß der *Bacillus aquatilis* - beide identisch mit *Aeromonas punctata* - "der gemeinste Wasserbacillus in Fluß- und Brunnenwasser sei".

Nach neueren Untersuchungen (Schubert 1967b) kommen diese Bakterien im Oberflächenwasser sogar in weit größerer Zahl vor als *Escherichia coli* und die coliformen Bakterien. An einem Bachlauf erhobene Befunde zeigten zudem, daß die Zunahme der *Aeromonaden* im Bachwasser - in einem mit Häusern besiedelten Areal - auf die Einleitung der Abläufe von Mehrkammerfaulgruben zurückzuführen ist. Von dieser Beobachtung ausgehend, konnte festgestellt werden, daß die *Aeromonaden* generell im häuslichen Abwasser in sehr großer Zahl vorkommen.

Ein faekaler Ursprung der Abwasser-Aeromonaden war ausgeschlossen worden. Schubert (1963) hatte aus 300 Stuhlproben von gesunden Menschen keinen *Aeromonas*-Stamm isoliert. Darüberhinaus war das Ergebnis von Kotuntersuchungen einiger Warmblüter ebenfalls negativ (Schubert 1967b). Aus diesen Gründen mußte die Besiedelung des Abwassers mit Aeromonaden im Schmutzwasser ableitenden System selbst gesucht werden. Bereits am Anfang des Entwässerungssystems in den Häusern konnten die Geruchsverschlüsse vor allem der Waschbecken als primäre Impfstellen ausgemacht werden. In den folgenden Abschnitten, in den Revisionsschächten und dem Hausanschlußkanal kommt es dann zu der Massenentwicklung der Aeromonaden, die für das häusliche Abwasser charakteristisch ist (Schubert 1967b). Durch die Kenntnis der Impfstelle in den Häusern war aber noch nicht geklärt, wie diese Massenentwicklung der Aeromonaden zustande kommt.

Wenn man davon ausgeht, daß mit den Faekalien und anderen Schmutzstoffen *Escherichia coli* und zum Teil auch *Enterobacter*- und *Citrobacter*-Bakterien in relativ großer Menge in das entstehende Abwasser eingebracht werden, dann mußten die Aeromonaden, da sie im Abwasser in größerer Zahl vorkommen als die genannten Bakteriengruppen, auch in diesem Biotop günstigere Wachstumsbedingungen finden. In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob Modellversuche zur Wachstums konkurrenz zwischen *Aeromonas hydrophila* und einigen *Enterobakterien* zur Klärung dieser Frage beitragen können.

Bei der Durchführung der Modellversuche konnten wir auf eine Reihe von Befunden zurückgreifen, die Martinstetter (1967) im Rahmen seiner Dissertationsarbeit erhoben hatte. Ausgehend von Fragen, die mit der Bewertung von Indikatorkeimen für die hygienische Wasserbeurteilung in Zusammenhang stehen, hat Martinstetter versucht, ein Modell aufzustellen, an dem die Wechselwirkung zweier gleichzeitig im gleichen Medium wachsender Bakterienstämme geprüft werden kann.

Da unter den natürlichen Umweltbedingungen das Nährstoffangebot praktisch immer als einer der limitierenden Faktoren anzusehen ist, hat Martinstetter zunächst geklärt, mit welchen Peptonkonzentrationen dieser Parameter im Modell simuliert werden kann. Bei konstant gehaltener Temperatur (20°C) zeigten die Versuche von Martinstetter, daß kein Antagonismus zwischen *Aeromonas hydrophila* und *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* und *Enterobacter aerogenes* besteht, sondern daß bei gleichzeitiger Einsaat zweier Bakterienstämme aus den genannten Gruppen im Ergebnis beide Stämme entsprechend ihrer Wachstumsgeschwindigkeit um den Nährstoff konkurrieren. Mit den von Martinstetter verwendeten Stämmen und unter seinen Versuchsbedingungen ist sein *Aeromonas*-Stamm den *Citrobacter*- und *Enterobacter*-stämmen jedoch immer unterlegen, ein Ergebnis, das den im Abwasser sich findenden Relationen nicht entspricht. Zwei Ursachen kommen zur Erklärung dieser Diskrepanz zwischen Modellversuch und den Verhältnissen im häuslichen Abwasser in Betracht:

- 1.) Im Abwasser herrschen niedrigere Temperaturen als Martinstetter seinem Modell zugrunde legte, nämlich maximal 10°C - 15°C .
- 2.) Martinstetter arbeitete mit einem alten Sammlungsstamm, der bei neueren Nachprüfungen einige für die Species *Aeromonas hydrophila* aberrierende Eigenschaften aufwies.

Die eigenen Untersuchungen wurden deshalb bei 10°C und 15°C durchgeführt; außerdem wurde neben dem von Kulp und Borden (1942) übernommenen Sammlungsstamm ein frisch aus Abwasser angezüchteter *Aeromonas hydrophila*-Stamm in die Versuche einbezogen.

3.00 Material

3.10 Bakterienstämme:

Folgende Stämme wurden für die Wachstumskonkurrenzversuche verwendet:

- 1.) Aeromonas hydrophila C₁:
Der Stamm wurde aus dem Abwasser der Stadt Brühl 1964 isoliert.
- 2.) Aeromonas hydrophila 43:
Dieser Stamm ist identisch mit dem von Kulp und Borden gezüchteten Stamm P₂. Die Autoren isolierten ihn 1942 aus einem an "red leg disease" erkrankten Frosch. Im ATCC-Katalog führt er die Nummer ATCC 9071.
- 3.) Escherichia coli 67/VI:
Der Stamm wurde aus einer zur Untersuchung eingesandten Trinkwasserprobe 1962 angezüchtet.
- 4.) Citrobacter freundii RT 1/2:
Der Stamm wurde aus einer Rana temporaria gezüchtet, die im Kottenforst 1964 eingefangen worden war.
- 5.) Enterobacter aerogenes ATCC 11439:
Die frühere Bezeichnung dieses Stammes ist Aerobacter cloacae. Clement züchtete ihn 1951 aus einem an "red sore" erkrankten Hecht und bezeichnete ihn N.R.C.492.

3.20 Rezepte1.) Peptonwasser

Als Nährlösung wurde für alle Versuche 0,001%ige Bacto-Peptonlösung (Peptonwasser) verwandt. Dabei gingen wir von einer 1%igen Lösung aus, die wir entsprechend mit gepuffelter, physiologischer Kochsalzlösung verdünnten.

1 g Bacto-Pepton
100 ml gepufferte, physiologische Kochsalzlösung
Einstellung auf pH 7,0

2.) Gepufferte, physiologische Kochsalzlösung

8,5 g NaCl
20 ml Phosphatpufferstammlösung
Aqua dest. ad 1.000 ml

Phosphatpufferstammlösung

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ Mol. Gew. 177,99 - 125,00 g,
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ Mol. Gew. 137,99 - 28,82 g;
Aqua dest. ad 1.000 ml

3.) Nähragar

2,5 g Fleischpepton Merck trypt. verd.
0,5 g NaCl
1,6 g Fadenagar
Aqua dest. ad 1.000 ml
Einstellung auf pH 7,5; in Petrischalen gegossen.

4.) Erycinagar

100 ml Nähragar

1000 µg Erycin

Dem Nähragar wird nach dem Abkühlen im Wasserbad kurz vor dem Gießen das Erycin zugesetzt.

5.) Cytochromoxydasereagenz

Lösung I:

1 g Dimethyl-p-phenyldiaminhydrochlorid

Aqua dest. ad 1.000 ml

Lösung II:

1 g α -Naphtol

Aethylalkohol ad 1.000 ml

Beide Lösungen werden in dunklen Flaschen im Kühlschrank aufbewahrt. Vor Gebrauch Mischung von Lösung I und Lösung II im Verhältnis 1:1.

4.00 Versuchstechnik

4.10 Herstellung der Bakteriensuspensionen

Um definierte Einsaaten zu erreichen, wurde von Bakteriensuspensionen ausgegangen. Zu diesem Zweck wurden jeweils ein paar Tropfen einer 4 - 8-stündigen Nährbouillonkultur auf je 5 Nähragarplatten aufgebracht, ausgespatelt und über Nacht bei 30°C bebrütet. Der Bakterienrasen der bewachsenen Platte wurde mittels Spatel jeweils in 5 ml gepufferter, physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Die so gewonnenen Zellsuspensionen wurden in Erlenmeyerkölbchen im Kühlschrank aufbewahrt. Entsprechend den Untersuchungen von Habs und Langeloh (1960) und von Joó (1965) waren die in

unseren Versuchen verwendeten Bakterienstämme als Aufschwemmung in gepufferter Kochsalzlösung bei Aufbewahrung im Kühlschrank (6°C) über mehrere Wochen haltbar; die Zahl der koloniebildenden Einheiten fiel erst nach längerer Zeit langsam ab.

4.20 Ermittlung der Zahl der koloniebildenden Einheiten

Zur Ermittlung der Zahl der koloniebildenden Einheiten der Bakteriensuspensionen bzw. bei den Modellversuchen im Nährsubstrat wurden Verdünnungsreihen in Zehnerstufen angelegt und zwar in der Weise, daß immer zu 4,5 ml steriler, gepufferter Kochsalzlösung 0,5 ml der zu verdünnenden Lösung zugesetzt wurde. Nach kräftigem Schütteln erfolgte dann unter Pipettenwechsel die weitere Verdünnung (zur nächsten Zehnerstufe) bzw. die Aussaat von 0,1 ml der entsprechenden Verdünnungsstufe auf die Zählplatte. Die auf das Nährmedium aufgebrachte Flüssigkeitsmenge wurde anschließend mit der Pipette auf der ganzen Oberfläche der Platte gleichmäßig verteilt. Nach 24-stündiger Bebrütung bei 30°C erfolgte die Auszählung der angewachsenen Kolonien.

4.30 Ansatz der Modellversuche zur Wachstumskonkurrenz

Die Modellversuche zur Wachstumskonkurrenz wurden wie folgt angelegt: 3 Erlenmeyerkölbchen mit je 50 ml 0,001%igem Peptonwasser wurden unter Zuhilfenahme der letzten Keimzahlbestimmung der zu verwendenden Bakteriensuspensionen mit der erwünschten Zahl von vermehrungsfähigen Keimen beimpft; es wurden in je eines der Kölbchen einer der zu prüfenden Stämme in Reinkultur (Kontrollversuche) und in das dritte Kölbchen beide Stämme zusammen (Konkurrenzversuche) eingebracht.

Direkt nach Ansatz des Versuches und in bestimmten Zeitabschnitten wurde die Zahl der koloniebildenden Einheiten in der oben beschriebenen Weise bestimmt. Dabei war es bei den verschiedenen

Stammkombinationen notwendig, eine geeignete Differenzierungsmöglichkeit heranzuziehen. Bei den Wachstumskonkurrenzversuchen zwischen *Aeromonas hydrophila* einerseits und *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes* und *Escherichia coli* andererseits war es möglich, die auf normalem Nährboden angewachsenen Kolonien mit Hilfe der Cytochromoxydase zu differenzieren. Nach Beträufeln der Platten mit etwas "Nadireagenz" aus der Pipette und gleichmäßigem Verteilen über die gewachsenen Kolonien hoben sich die Aeromonaden in 1 - 2 Minuten in tiefblauen Kolonien von den Enterobakterien auf der Nährbodenplatte ab.

In einigen Fällen kam es dazu, daß die Aeromonaden einen der Konkurrenzstämme völlig überwucherten, so daß dieser nach einiger Zeit nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Durch Zusatz von Erycin zum Nähragar (Erycinagar) wurden die Aeromonaden im Wachstum vollständig gehemmt; der unterdrückte Konkurrenzstamm konnte dadurch selbst in niedriger Konzentration auf der Platte nachgewiesen werden.

5.00 Ergebnisse der Modellversuche

5.10 Wachstumsgeschwindigkeit der Versuchsstämme bei 15°C und 10°C

Um in den später durchzuführenden Modellversuchen die gegenseitige Wachstumsbeeinflussung der miteinander konkurrierenden Bakterienstämme besser beurteilen zu können, untersuchten wir zunächst die wachstumsphysiologischen Eigenschaften eines jeden Stammes in Reinkultur.

Entsprechend der im Abschnitt Versuchstechnik (4.00) beschriebenen Methode wurden 500 - 6.000 koloniebildende Einheiten eines jeden Stammes in 50 ml des 0,001% Pepton enthaltenden Peptonwassers eingesät und bei 15°C bzw. 10°C über 10 Tage untersucht, wobei die Zahl der koloniebildenden Einheiten in bestimmten Zeitintervallen festgestellt wurde. Die gefundenen Meßwerte (Zahl der koloniebildenden Einheiten) ergeben, aufgetragen auf halblogarithmischem Papier, gegen die Zeitachse vergleichbare Wachstumskurven. Eine Zusammenstellung der Wachstumskurven aller Stämme bei einer Bebrütungstemperatur von 15°C findet sich in Abbildung 1, eine analoge Darstellung der Verhältnisse bei 10°C Bebrütung ist in Abbildung 2 wiedergegeben.

Zunächst wollen wir die Wachstumsverhältnisse bei 15°C Bebrütungstemperatur vergleichen. Aus Abbildung 1 ist ersichtlich, daß die Kurven des *Aeromonas*-Stammes C₁ und von *Citrobacter freundii* RT 1/2 kurz nach der Einsaat steil ansteigen. *Aeromonas hydrophila* C₁ hatte sich bereits 21 Stunden nach der Einsaat um zwei Zehnerpotenzen vermehrt; bei einer Einsaatmenge von 70 vermehrungsfähigen Einheiten pro ml zählten wir am ersten Tag (nach 21 Stunden) $7,8 \times 10^3$ Einheiten pro ml. Am zweiten Wachstumstag (48 Stunden nach der Einsaat) hatte sich der *Aeromonas*-Stamm um mehr als drei Zehnerpotenzen - nämlich auf $1,4 \times 10^7$ Einheiten

pro ml vermehrt; mit diesem Zählwert hatte *Aeromonas hydrophila* C₁ seinen Endwert bereits erreicht.

Die Wachstumsverhältnisse von *Citrobacter freundii* RT 1/2 sind denen von *Aeromonas hydrophila* C₁ ähnlich. Der *Citrobacter*-Stamm hatte sich in 24 Stunden von 15 Einheiten pro ml auf $1,6 \times 10^3$ koloniebildende Einheiten pro ml vermehrt. Am zweiten Tag (48 Stunden nach der Einsaat) war *Citrobacter freundii* RT 1/2 auf $5,9 \times 10^5$ Einheiten pro ml angestiegen; die *Citrobacter*-Kurve liegt also zu diesem Zeitpunkt eine Zehnerpotenz unterhalb der Kurve von *Aeromonas hydrophila* C₁. Nach 3 Tagen (68 Stunden nach der Einsaat) ging der *Citrobacter*-Stamm mit dem gleichen Zählwert wie *Aeromonas hydrophila* C₁ - nämlich $1,1 \times 10^7$ Einheiten pro ml - in die stationäre Phase über.

Der Kurvenverlauf der übrigen drei Versuchsstämme ist flacher. Der nach Abbildung 1 scheinbar anfänglich steile Kurvenverlauf von *Aeromonas hydrophila* 43 beruht darauf, daß vergleichsweise eine zu hohe Einsaatmenge gewählt worden war. Am ersten Tag (nach 22 Stunden) zählten wir 3720 vermehrungsfähige Einheiten pro ml. Von diesem Zeitpunkt ab vermehrte sich *Aeromonas hydrophila* 43 an den folgenden Tagen fast um eine Zehnerpotenz und erreichte nach 2 Tagen (48 Stunden nach der Einsaat) $1,5 \times 10^5$ Einheiten pro ml. Mit einer Anzahl von $3,9 \times 10^6$ koloniebildenden Einheiten pro ml ging *Aeromonas hydrophila* 43 am vierten Wachstumstag (nach 96 Stunden) - also 24 Stunden später als *Aeromonas hydrophila* C₁ und *Citrobacter freundii* RT 1/2 - in die Endphase ein und blieb in der M-Konzentration deutlich unter den Werten der zuerst besprochenen Stämme zurück.

Die Wachstumskurven von *Enterobacter aerogenes* ATCC 11439 und *Escherichia coli* 67/VI verlaufen nach Abbildung 1 flacher als die Kurven von *Aeromonas hydrophila* C₁ und *Citrobacter freundii* RT 1/2. Im Gegensatz zur Colikurve steigt die Kurve von *Enterobacter aerogenes* jedoch zunächst steil an, da sich der *Enterobacter*-Stamm infolge einer kürzeren Initialphase früher zu vermehren begann.

Bei einer Einsaat von 25 vermehrungsfähigen Einheiten pro ml fanden wir nach einem Tag (24 Stunden nach der Einsaat) einen Wachstumsanstieg auf 250 Einheiten pro ml, wohingegen wir von *Escherichia coli* nach der gleichen Zeitspanne noch ungefähr die Menge der Einsaat vorfanden. Am zweiten Tag (nach weiteren 24 Stunden) erreichten beide Stämme mit ca. $3,8 \times 10^3$ Einheiten pro ml ungefähr den gleichen Zählwert, und von jetzt an waren beide Stämme in ihrem wachstumsphysiologischen Verhalten nahezu gleich. Von beiden Stämmen wurde nach 4 Tagen (96 Stunden nach der Einsaat) die Endkonzentration erreicht, wobei *E. coli* 67/VI etwas unter dem Wert von *Enterobacter aerogenes* ATCC 11439 lag. Vom *Enterobacter*-Stamm fanden wir am vierten Tag als höchsten Wert $1,1 \times 10^7$ Einheiten pro ml, während sich der *E. coli*-Stamm auf $7,7 \times 10^6$ Einheiten pro ml vermehrt hatte.

Vergleichen wir die Wachstumsvorgänge bei 15°C zusammenfassend, so zeichnen sich *Aeromonas hydrophila* C₁ und *Citrobacter freundii* RT 1/2 durch schnelleres Wachstum aus als die übrigen untersuchten Stämme. Die Gründe hierfür sind eine kürzere Initialphase sowie eine schnellere Zellteilung in der exponentiellen Wachstumsphase. Die übrigen Versuchsstämme - also *Enterobacter aerogenes* ATCC 11439, *Aeromonas hydrophila* 43 und *E. coli* 67/VI erreichen ihre maximale Endkonzentration erst 24 Stunden später. Diese liegt für unsere Versuchsstämme - mit Ausnahme von *Aeromonas hydrophila* 43 - etwa in der gleichen Größenordnung, nämlich bei $1,0 \times 10^7$ Einheiten pro ml. Demgegenüber liegt *Aeromonas hydrophila* 43 unter unseren Wachstumsbedingungen in seiner Endkonzentration etwa eine halbe Zehnerpotenz tiefer.

Zur Untersuchung der Wachstumsvorgänge bei 10°C Bebrütungstemperatur impften wir wiederum 6.000 - 15.000 vermehrungsfähige Einheiten eines jeden Stammes in je 50 ml Nährmedium ein und beobachteten die Vermehrung der Bakterien wiederum über 10 Tage. Unter den jetzigen Versuchsbedingungen ist die Tatsache am herorstechendsten, daß *Escherichia coli* nicht mehr vermehrungsfähig ist. Die gefundenen Meßwerte entsprachen aber während der Versuchs-

zeit der Einsaatmenge; es kam nicht zu einem Absterben der Bakterienzellen.

Von den übrigen Versuchsstämmen zeichneten sich wiederum *Aeromonas hydrophila* C₁ und *Citrobacter freundii* RT 1/2 durch ein schnelles Wachstum aus. Gleich nach Versuchsbeginn steigt die Kurve von *Aeromonas hydrophila* C₁ steil an; sie verläuft jedoch flacher als bei 15°C. Nach 2 Tagen (48 Stunden nach der Einsaat) hatte sich der *Aeromonas*-Stamm von 280 Einheiten pro ml auf $2,2 \times 10^4$ koloniebildende Einheiten pro ml vermehrt. Nach weiteren 24 Stunden - also zu dem Zeitpunkt, da der Stamm bei 15°C-Kultur bereits die M-Konzentration erreicht hat - war *Aeromonas hydrophila* C₁ um eine weitere Zehnerpotenz angestiegen. Nach 5 Tagen (nach 118 Stunden) trat *Aeromonas hydrophila* C₁ mit $1,1 \times 10^7$ Einheiten pro ml in die stationäre Phase ein; bei 10°C dauert es demnach 48 Stunden länger, bis das Ende der exponentiellen Phase erreicht wird.

Die Kurve des *Citrobacter*-Stammes liegt in Abbildung 2 unter der Kurve von *Aeromonas hydrophila* C₁. Die Initialphase von *Citrobacter freundii* hatte sich bei 10°C um 24 Stunden verlängert; nach 2 Tagen (48 Stunden nach der Einsaat) fanden wir bei einer Einimpfung von 140 koloniebildenden Einheiten pro ml etwa 940 Einheiten pro ml vor. Vom zweiten Tag an verläuft die *Citrobacter*-kurve steiler; am vierten Tag (nach 96 Stunden) betrug die Zahl der koloniebildenden Einheiten $1,7 \times 10^5$. Mit diesem Zählwert lag *Citrobacter freundii* eine Zehnerpotenz unter dem Wert von *Aeromonas hydrophila* C₁ zum gleichen Zeitpunkt. Am siebten Wachstumstag (nach 168 Stunden) erreichte *Citrobacter freundii* RT 1/2 mit ca. $9,8 \times 10^6$ koloniebildenden Einheiten pro ml seinen höchsten Zellwert.

Die Kurve des *Enterobacter*-Stammes ATCC 11439 verläuft nach Abbildung 2 flacher als diejenige des *Citrobacter*-Stammes. Auch bei diesem Stamm dauerte die Initialphase 24 Stunden; am zweiten Tag (nach 48 Stunden) stellten wir eine Vermehrung auf 910 kolo-

niebildende Einheiten pro ml fest, wenn wir 250 Einheiten einsäten. In der exponentiellen Phase verhielt sich *Enterobacter aerogenes* ähnlich wie *Citrobacter freundii*. Am vierten Tag (nach 96 Stunden) hatte er sich auf $8,6 \times 10^4$ Einheiten pro ml vermehrt. Nach 8 Tagen (nach 192 Stunden) ging er mit $1,3 \times 10^7$ Einheiten pro ml in die Endphase ein.

Betrachten wir vergleichsweise die Wachstumsvorgänge von *Aeromonas hydrophila* 43, so erkennen wir einen gleichmäßigen jedoch gegenüber den anderen Stämmen langsameren Wachstumsanstieg dieses *Aeromonas*-Stammes. Zunächst verläuft seine Kurve in Abbildung 2 identisch mit derjenigen von *Enterobacter aerogenes* und *Citrobacter freundii*. Am dritten Tag (nach 72 Stunden) stimmte der gefundene Wert von $8,3 \times 10^3$ Einheiten pro ml mit der Zellzahl der beiden anderen Stämme zur gleichen Zeit überein. Nach 6 Tagen (120 Stunden nach der Einsaat) lag der gefundene Wert von $3,1 \times 10^5$ Einheiten pro ml beträchtlich unter dem Wert der übrigen Versuchsstämme. Um die Endphase zu erreichen, benötigte *Aeromonas hydrophila* 43 nochmals 48 Stunden. Am achten Tag (nach 190 Stunden) fanden wir $8,7 \times 10^5$ koloniebildende Einheiten pro ml; 24 Stunden später hatte sich der Stamm noch auf $1,2 \times 10^6$ Einheiten pro ml vermehrt.

Aus dem Vergleich der Versuchsreihe bei 15° und 10°C wird der Einfluß der Temperatur auf das Bakterienwachstum deutlich. Anders als bei 15°C , ist *Escherichia coli* bei 10°C Bebrütung nicht mehr vermehrungsfähig. Die übrigen Versuchsstämme vermehren sich bei der niederen Temperatur langsamer und erreichen die maximale Keimdichte später als bei 15°C . So benötigt *Aeromonas hydrophila* C₁ bei 10°C beispielsweise 48 Stunden länger, um in die Endphase überzugehen; dennoch erreichen *Aeromonas hydrophila* C₁, *Citrobacter freundii* RT 1/2 und *Enterobacter aerogenes* ATCC 11439 bei beiden Temperaturen ungefähr den gleichen Endwert von etwa $1,0 \times 10^7$ Einheiten pro ml. Das langsamere Wachstum bei der niederen Temperatur erklärt sich sowohl aus einer längeren Initialphase wie auch aus einer langsameren Teilungszeit in der exponentiellen

Abb. 1: Wachstumsgeschwindigkeit der Stämme bei 15°C

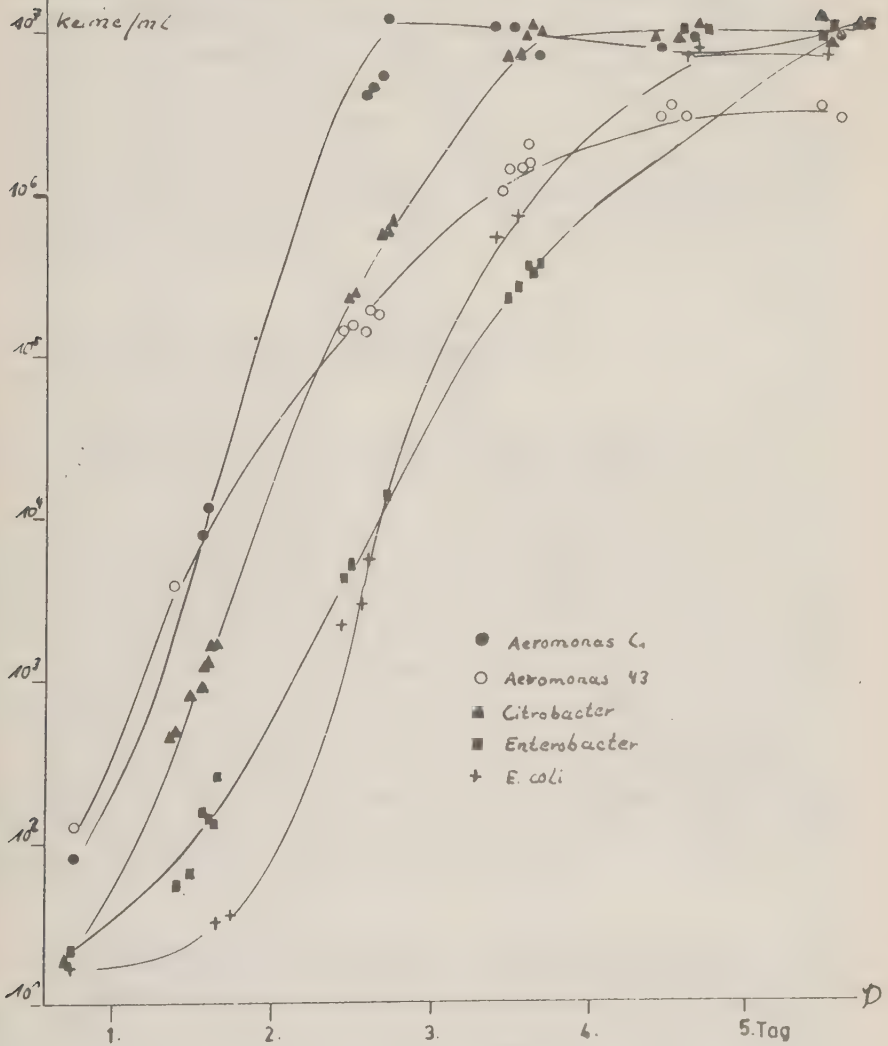
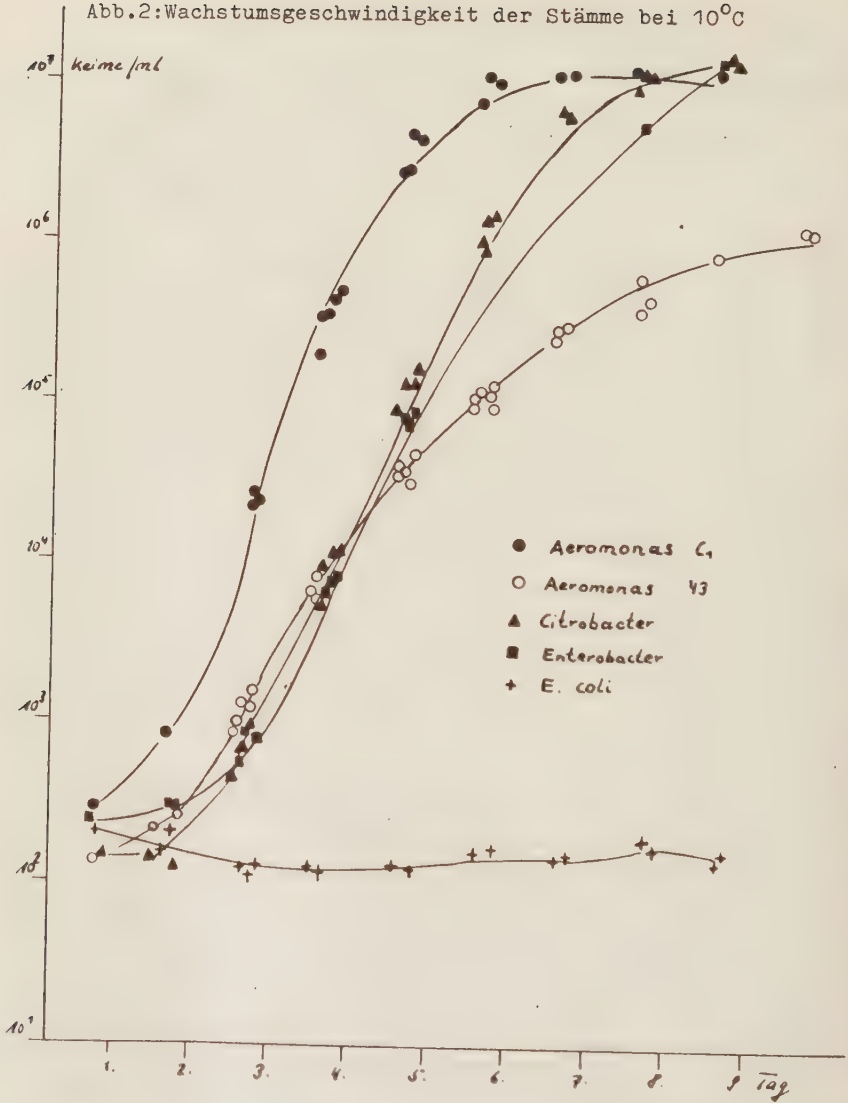


Abb.2: Wachstumsgeschwindigkeit der Stämme bei 10°C



Phase. Eine Verlängerung der Initialphase zeigen bei 10°C alle Stämme mit Ausnahme von *Aeromonas hydrophila* C₁. In der exponentiellen Phase vermehrt sich insbesondere der Stamm *Aeromonas hydrophila* 43 wesentlich langsamer als die übrigen vermehrungsfähigen Stämme; seine M-Konzentration liegt bei 10°C eine Zehnerpotenz unter der M-Konzentration der übrigen Stämme und dem bei 15°C erreichten höchsten Zählwert. Bei *Aeromonas hydrophila* 43 und *E. coli* 67/VI machte sich der Einfluß des Temperaturabfalls am stärksten bemerkbar.

5.20 Beschreibung der Konkurrenzversuche

5.21 Konkurrenzversuche zwischen dem Stamm *Aeromonas hydrophila* C₁ und den untersuchten Enterobacteriaceen

Zur Untersuchung der wechselseitigen Wachstumsbeeinflussung zwischen *Aeromonaden* und *Enterobakterien* dienten folgende Stämme: *Aeromonas hydrophila* C₁, *Escherichia coli* 67/VI, *Enterobacter aerogenes* ATCC 11439 und *Citrobacter freundii* RT 1/2. Wir prüften die Wachstumskonkurrenz dieser Stämme bei einer Temperatur von 10°C und 15°C. In einigen Fällen vermehrte sich der *Aeromonas*-Stamm so schnell, daß der konkurrierende Partner nach unserer Plattenmethode nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Durch Verwendung eines Erycinzusatzes zum Agarnährboden (10 µg/ml) wurde das Wachstum der *Aeromonaden* jedoch vollständig gehemmt; die Auszählung des überwucherten Konkurrenten war nun möglich.

5.2111 Wachstumskonkurrenz zwischen *Aeromonas hydrophila* C₁ und *Escherichia coli* 67/VI bei 15°C

Um die Wachstumskonkurrenz zwischen *Aeromonas hydrophila* C₁ und *Escherichia coli* 67/VI bei 15°C zu beobachten, impften wir etwa 10.000 *Aeromonaden* und 7.500 *Escherichien* in 50 ml Peptonwasser

ein (Konkurrenzversuch); als Kontrolle dienten zwei weitere Kölbchen, die mit den Stämmen in Reinkultur mit der gleichen Einsaatmenge beschickt wurden.

Nach Abbildung 3 ergab die erste Keimzahlbestimmung nach 24-stündiger Bebrütung bei 15°C für den *Aeromonas*-Stamm einen Wachstumsanstieg von 250 auf $5,0 \times 10^3$ koloniebildende Einheiten pro ml. An den folgenden Tagen vermehrte sich *Aeromonas hydrophila* C₁ in Reinkultur wie auch in der Konkurrenz sehr schnell; bereits drei Tage nach der Einsaat (nach 67 Stunden) erreichte er die Endkonzentration mit $2,5 \times 10^7$ Einheiten pro ml. Im Gegensatz dazu vermehrte sich der *E. coli*-Stamm in Reinkultur wesentlich langsamer, was aus dem flacheren Verlauf der Wachstumskurve der *E. coli*-Reinkultur in Abbildung 3 ersichtlich ist. Am ersten Tag (24 Stunden nach der Einsaat) erhielten wir von *Escherichia coli* 67/VI in Reinkultur wie auch im Ansatz mit *Aeromonas hydrophila* C₁ den gleichen Wert wie am Vortag. Am dritten Wachstumstag (nach 67 Stunden) lag die Zahl der koloniebildenden Einheiten in der *E. coli*-Reinkultur mit $9,9 \times 10^4$ Einheiten pro ml ungefähr zwei Zehnerpotenzen unter dem Zählwert von *Aeromonas hydrophila* C₁ zu diesem Zeitpunkt. Nach 5 Tagen (116 Stunden nach der Einsaat) erreichte die *E. coli*-Reinkultur mit $9,1 \times 10^6$ Einheiten pro ml die M-Konzentration. Der mit *Aeromonas hydrophila* C₁ wachsende *E. coli*-Stamm blieb unter den Kontrollwerten; die Endkonzentration des *E. coli*-Stammes im Konkurrenzversuch lag mehr als eine halbe Zehnerpotenz unter der M-Konzentration der Reinkultur und eine Zehnerpotenz unter der M-Konzentration von *Aeromonas hydrophila* C₁.

Ein zusammenfassender Vergleich der 4 Kurven in Abbildung 3 zeigt, daß *Escherichia coli* 67/VI nach einer längeren Initialphase als *Aeromonas hydrophila* C₁ seiner geringeren Wachstumsgeschwindigkeit entsprechend eine flachere Wachstumskurve zeigt als der *Aeromonas*-Stamm. Die Vermehrungsgeschwindigkeit des *E. coli*-Stammes in der Konkurrenz nimmt mit zunehmender Keimkonzentration des *Aeromonas*-Stammes deutlich ab, während die *E. coli*-

Reinkultur das Wachstum mit unverminderter Geschwindigkeit bis zum Erreichen der Endkonzentration fortsetzt. So kommt es, daß *Aeromonas hydrophila* C₁ in Reinkultur wie in der Konkurrenz praktisch die gleiche Endkonzentration erzielt, der *E. coli*-Stamm in Konkurrenzversuch jedoch hinter der Reinkultur und dem *Aeromonas*-Stamm zurückbleibt.

5.2112 Wachstumskonkurrenz zwischen *Aeromonas hydrophila* C₁ und *Escherichia coli* 67/VI bei 10°C

Um *Escherichia coli* 67/VI während der gesamten Versuchszeit nachweisen zu können, wurde *Aeromonas hydrophila* C₁ durch Zugabe von Erycin zum Nährboden vollständig gehemmt. Es zeigte sich, daß sich der *E. coli*-Stamm unter den jetzigen Bedingungen nicht mehr vermehrte; er blieb sowohl in Reinkultur wie auch in der Konkurrenz im Verhältnis der Einsaatmenge - etwa 160 Einheiten pro ml - nachweisbar.

Nach Abbildung 4 verlaufen die *Aeromonas*-Kurven nahezu gleichsinnig; 2 Tage nach der Einsaat (nach 48 Stunden) erreichte der *Aeromonas*-Stamm in Reinkultur wie im Konkurrenzversuch $2,0 \times 10^4$ koloniebildende Einheiten pro ml. An den beiden folgenden Tagen vermehrte sich *Aeromonas hydrophila* C₁ täglich um eine Zehnerpotenz und ging am fünften Tag (nach 120 Stunden) mit $1,6 \times 10^7$ Einheiten pro ml in die stationäre Phase über.

Auch bei 10°C vermehren sich die *Aeromonaden* ihrer Wachstumsgeschwindigkeit entsprechend. Die *Escherichien* dagegen zeigen keine Vermehrung. Da wir sie in Reinkultur wie in der Konkurrenz bis zum Versuchsschluß nachweisen konnten, bewirkte *Aeromonas hydrophila* C₁ kein Absterben des *E. coli*-Stammes.

Abb. 3: Wachstumskonkurrenz zwischen *Aeromonas hydrophila* C₁ und *E. coli* 67/VI bei 15°C

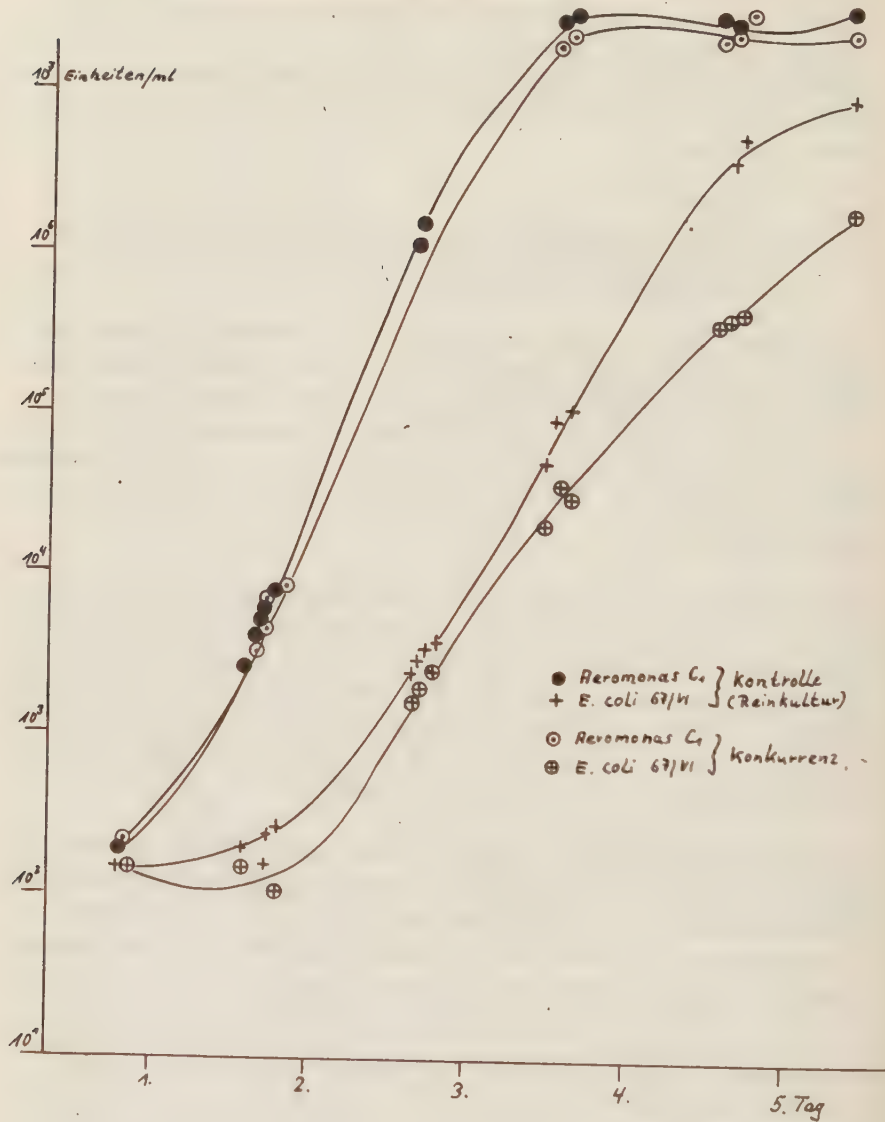
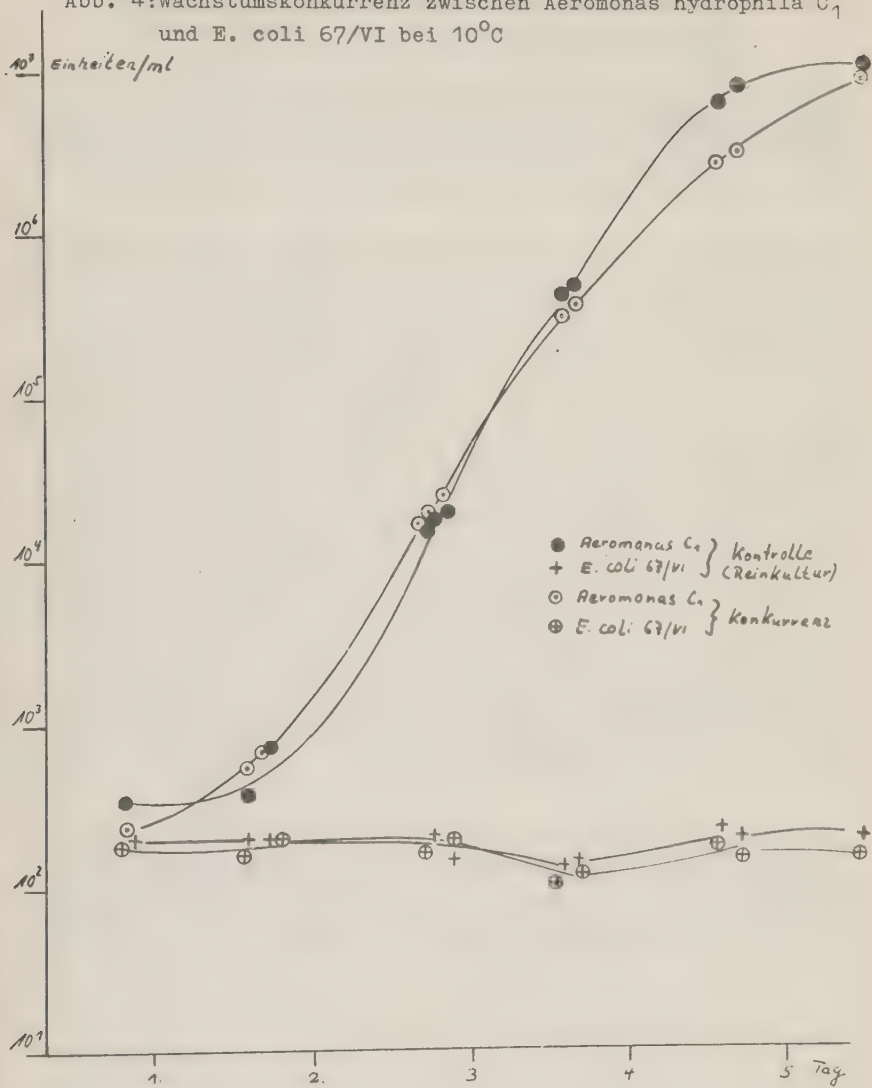


Abb. 4: Wachstums konkurrenz zwischen *Aeromonas hydrophila* C₁ und *E. coli* 67/VI bei 10°C



5.2121 Wachstumskonkurrenz zwischen *Aeromonas hydrophila* C₁ und *Enterobacter aerogenes* ATCC 11439 bei 15°C

In Fortführung der Konkurrenzversuche beschickten wir 50 ml Peptonwasser mit 3.500 *Aeromonaden* und 6.000 vermehrungsfähigen Einheiten von *Enterobacter aerogenes* ATCC 11439; die gleichen Mengen säten wir in je zwei weitere Kölbchen getrennt ein.

Nach Abbildung 5 verlaufen die beiden *Aeromonaskurven* wiederum nahezu gleichsinnig. In 22 Stunden hatte sich *Aeromonas hydrophila* C₁ auf $3,8 \times 10^3$ Einheiten pro ml vermehrt. Bereits am zweiten Tag (nach 48 Stunden) erreichte der *Aeromonas*-Stamm mit $1,4 \times 10^7$ Einheiten pro ml die Endkonzentration. Demgegenüber lag der Zählwert von *Enterobacter aerogenes* in Reinkultur wie in der Konkurrenz zu diesem Zeitpunkt um mehr als eine Zehnerpotenz niedriger. Erst nach drei Tagen (nach 72 Stunden) erreichte die *Enterobacter*-Reinkultur die M-Konzentration mit $1,0 \times 10^7$ Einheiten pro ml; dieser Wert entspricht größenordnungsmäßig der Endkonzentration des *Aeromonas*-Stammes. Von *Enterobacter aerogenes* zählten wir in der Konkurrenz nach 3 Tagen (72 Stunden nach der Einsaat) als höchsten Wert nur $2,0 \times 10^6$ Einheiten pro ml; die M-Konzentration des *Enterobacter*-Stammes in Konkurrenz mit *Aeromonas hydrophila* C₁ lag also um mehr als eine halbe Zehnerpotenz unter dem Kontrollwert und der von *Aeromonas hydrophila* C₁ erreichten Endkonzentration.

In diesem Versuchsansatz vermehrt sich *Aeromonas hydrophila* C₁ schneller als der mit ihm konkurrierende Partner; *Enterobacter aerogenes* ATCC 11439 kann daher in der Konkurrenz die ihm entsprechende M-Konzentration nicht erreichen.

Abb. 5: Wachstumskonkurrenz zwischen *Aeromonas hydrophila* C₁ und *Enterobacter aerogenes* ATCC 11439 bei 15°C

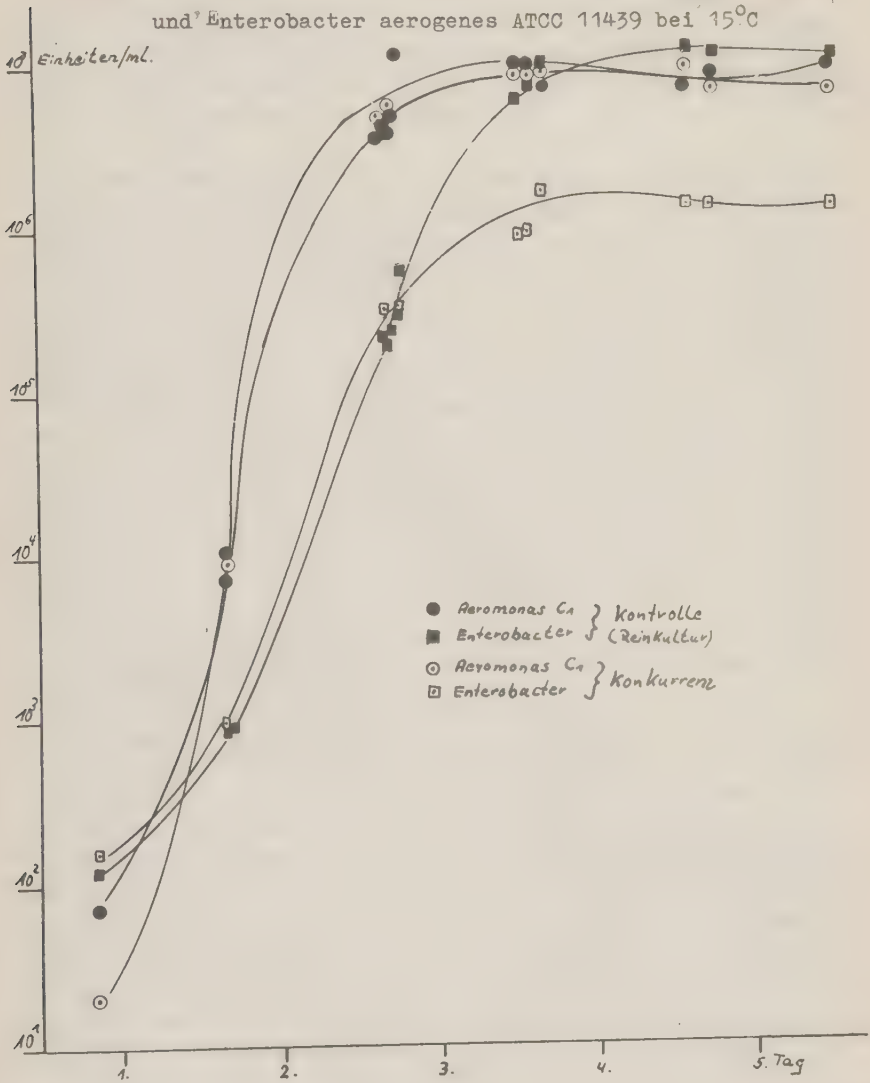


Abb. 6:Wachstumskonkurrenz zwischen *Aeromonas hydrophila* C₁
und *Enterobacter aerogenes* ATCC 11439 bei 10°C



5.2122 Wachstumskonkurrenz zwischen *Aeromonas hydrophila* C₁ und *Enterobacter aerogenes* ATCC 11439 bei 10°C

Wie Abbildung 6 veranschaulicht, wächst der *Aeromonas*-Stamm bei 10°C schneller als der *Enterobacter*-Stamm. Um zu vermeiden, daß dieser von den *Aeromonaden* auf den Platten überwuchert wurde, verwendeten wir wiederum Erycin-Agar.

Die Einsaatmenge von *Enterobacter aerogenes* übertraf diejenige des *Aeromonas*-Stammes um eine Zehnerpotenz (siehe Abbildung 6). Trotz dieser hundertfachen Überzahl wuchs *Aeromonas hydrophila* C₁ in der Konkurrenz wesentlich schneller als *Enterobacter aerogenes*. In 3 Tagen (nach 72 Stunden) hatte sich der *Aeromonas*-Stamm in Reinkultur wie in der Konkurrenz auf $4,5 \times 10^5$ koloniebildende Einheiten pro ml vermehrt; nach 5 Tagen (120 Stunden nach der Einsaat) war die Endkonzentration des *Aeromonas*-Stammes mit $2,0 \times 10^7$ Einheiten pro ml erreicht. Die Wachstumskurve des *Enterobacter*-Stammes verläuft infolge einer längeren Initi-
alphase zunächst flach; vom zweiten Wachstumstag an wird sie steiler. Nach 6 Tagen (144 Stunden nach der Einsaat) wurde die M-Konzentration von der *Enterobacter*-Reinkultur mit $1,0 \times 10^7$ Einheiten pro ml erreicht. Der mit *Aeromonas hydrophila* C₁ konkurrierende *Enterobacter*-Stamm dagegen blieb um etwa eine Zehnerpotenz unter der M-Konzentration der Reinkultur und der von *Aeromonas hydrophila* erreichten M-Konzentration.

Die Abbildungen 5 und 6 zeigen, daß die Verhältnisse der Wachstumskonkurrenz zwischen den beiden Stämmen bei 10°C und 15°C ähnlich sind. In beiden Versuchen erweist sich der *Aeromonas*-Stamm in der Konkurrenz als der schneller wachsende Stamm; dagegen vermehrt sich *Enterobacter aerogenes* wesentlich langsamer; in der Konkurrenz kann der *Enterobacter*-Stamm die Kontrollwerte nicht erreichen und unterliegt in der M-Konzentration, wobei die Werte der Endkonzentration in der Konkurrenz bei 10°C wie auch bei 15°C eine halbe Zehnerpotenz unter denen der Reinkultur liegen.

5.2131 Wachstumskonkurrenz zwischen *Aeromonas hydrophila* C₁ und *Citrobacter freundii* RT 1/2 bei 15°C

Die Ergebnisse der wechselseitigen Wachstumsbeeinflussung zwischen *Aeromonas hydrophila* C₁ und *Citrobacter freundii* RT 1/2 bei 15°C gibt die Abbildung 7 wieder. Als Einsaatmenge in 50 ml Peptonwasser wurden 5.000 vermehrungsfähige Einheiten eines jeden Stammes gewählt.

Gemäß Abbildung 7 verhalten sich die beiden Stämme in Reinkultur wachstumsphysiologisch fast gleich. Am zweiten Wachstumstag (48 Stunden nach der Einsaat) zählten wir von beiden Stämmen in Reinkultur wie auch in der Konkurrenz etwa $2,0 \times 10^5$ vermehrungsfähige Einheiten pro ml. Nach 3 Tagen (68 Stunden nach der Einsaat) erreichten die Reinkulturen von *Aeromonas hydrophila* C₁ und *Citrobacter freundii* RT 1/2 die Endphase mit $1,3 \times 10^7$ Einheiten pro ml. Der höchste Zählwert des konkurrierenden *Aeromonas*-Stammes lag mit $1,6 \times 10^7$ Einheiten pro ml etwas höher als der Kontrollwert. Demgegenüber blieb *Citrobacter freundii* im Konkurrenzversuch mit $9,0 \times 10^6$ Einheiten pro ml etwas unter der M-Konzentration der Reinkultur.

In diesem Versuch erweisen sich die konkurrierenden Stämme in wachstumsphysiologischer Hinsicht als gleichwertige Partner. In der Konkurrenz bleibt *Citrobacter freundii* RT 1/2 dem *Aeromonas*-Stamm in der M-Konzentration unterlegen.

5.2132 Wachstumskonkurrenz zwischen *Aeromonas hydrophila* C₁ und *Citrobacter freundii* RT 1/2 bei 10°C

Es wurden etwa 10.000 vermehrungsfähige Einheiten von beiden Stämmen in 50 ml Peptonwasser eingepft und bei 10°C bebrütet.

Unter den jetzigen Bedingungen vermehrte sich der *Citrobacter*-Stamm langsamer als *Aeromonas hydrophila* C₁ (siehe Abbildung 8).

Abb. 7: Wachstumskonkurrenz zwischen *Aeromonas hydrophila* C₁
und *Citrobacter freundii* RT 1/2 bei 15°C

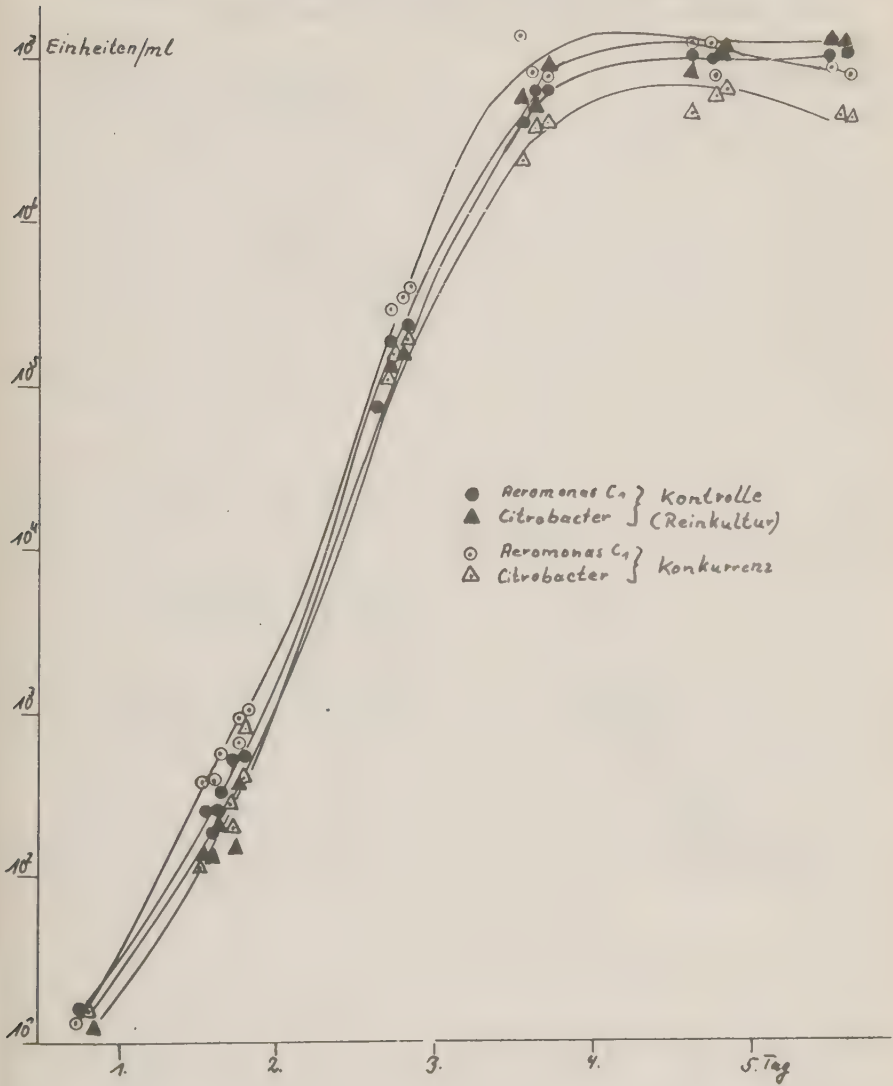
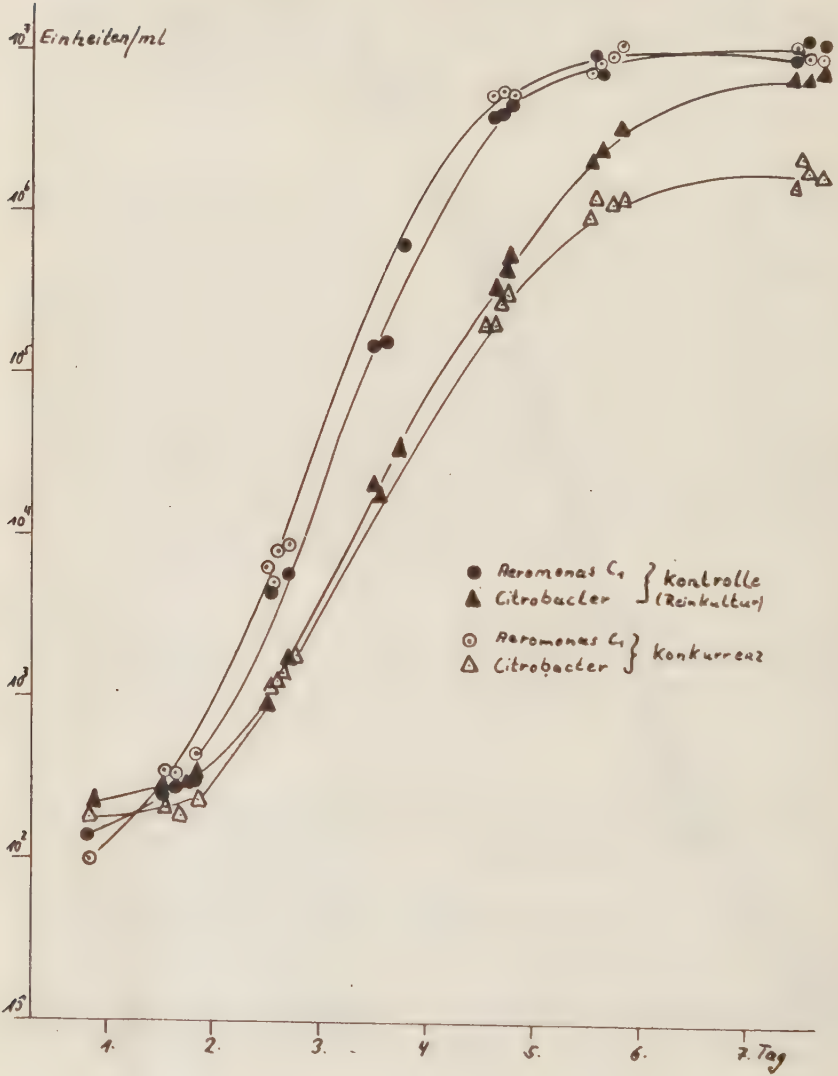


Abb. 8: Wachstumskonkurrenz zwischen *Aeromonas hydrophila* C₁ und *Citrobacter freundii* RT 1/2 bei 10°C



Aeromonas hydrophila C₁ war in 2 Tagen (nach 48 Stunden) auf $5,6 \times 10^3$ vermehrungsfähige Einheiten pro ml angewachsen und erreichte nach 5 Tagen (120 Stunden nach der Einsaat) in Reinkultur wie auch in der Konkurrenz mit $1,0 \times 10^7$ Einheiten pro ml die Endphase. Demgegenüber vermehrte sich der *Citrobacter*-Stamm bei gleicher Einsaatmenge nach 2 Tagen (nach 48 Stunden) in Reinkultur wie im Ansatz mit *Aeromonas hydrophila* C₁ nur auf $1,6 \times 10^3$ Einheiten pro ml. Am sechsten Tag (nach 144 Stunden) erreichte er in Reinkultur mit $8,0 \times 10^6$ Einheiten pro ml die Endphase. Die Zählwerte des mit *Aeromonas hydrophila* C₁ konkurrierenden *Citrobacter*-Stammes blieben unter denen der Kontrolle; die von *Citrobacter freundii* in der Konkurrenz erreichte M-Konzentration war eine Zehnerpotenz niedriger als die M-Konzentration der *Citrobacter*-Reinkultur und der M-Konzentration von *Aeromonas hydrophila* C₁.

Die Konkurrenzversuche zwischen *Aeromonas hydrophila* C₁ und *Citrobacter freundii* RT 1/2 zeigen, daß die Unterdrückung in der M-Konzentration des *Citrobacter*-Stammes von der Temperatur abhängig ist; sie ist bei 10°C stärker als bei 15°C, da sich *Aeromonas hydrophila* C₁ bei 10°C schneller vermehrt als der *Citrobacter*-Stamm.

Ein zusammenfassender Vergleich der besprochenen Versuche ergibt, daß sich *Aeromonas hydrophila* C₁ in der Konkurrenz mit einem Stamm aus der Familie der Enterobacteriaceen jedesmal seiner den Versuchsbedingungen entsprechenden Wachstumsgröße vermehrt. Die untersuchten Enterobacteriaceen vermehren sich bei den Versuchstemperaturen meist langsamer und unterliegen in der Konkurrenz dem schneller wachsenden *Aeromonas*-Stamm.

5.22 Konkurrenzversuche zwischen *Aeromonas hydrophila* 43
und *E. coli* 67/VI bzw. *Citrobacter freundii* RT 1/2
bei 15°C und 10°C

Die wechselseitige Wachstumsbeeinflussung zwischen dem Stamm *Aeromonas hydrophila* 43 und einigen Enterobacteriaceen ist bereits von P. Martinstetter (1967) bei 20°C untersucht worden. Unter den aufgestellten Versuchsbedingungen blieb *Aeromonas hydrophila* 43 in der Konkurrenz mit *Citrobacter freundii* RT 1/2 sowie *Enterobacter aerogenes* ATCC 11439 jedesmal unterlegen. Da dieses Ergebnis nicht mit der Relation übereinstimmt, in der sich Aeromonaden und Enterobacteriaceen im Oberflächenwasser finden, untersuchten wir die Wachstumskonkurrenz zwischen den Stämmen in einem der Umwelt besser angepaßten Milieu - nämlich in einem Temperaturbereich von 15°C und 10°C.

Die Untersuchungen über das Einzelwachstum der Versuchsstämme hatten bereits ergeben, daß sich *Aeromonas hydrophila* 43 bei 15°C langsamer als *Aeromonas hydrophila* C₁ und *Citrobacter freundii* RT 1/2 vermehrt; bei 10°C wächst *Aeromonas hydrophila* 43 sogar noch langsamer als *Enterobacter aerogenes* ATCC 11439. Um das wachstumsphysiologische Verhalten von *Aeromonas hydrophila* 43 mit demjenigen von *Aeromonas hydrophila* C₁ vergleichen zu können, wiederholten wir einige der zuvor mit *Aeromonas hydrophila* C₁ durchgeführten Konkurrenzversuche mit dem Stamm *Aeromonas hydrophila* 43.

5.2211 Wachstumskonkurrenz zwischen *Aeromonas hydrophila* 43 und *Escherichia coli* 67/VI bei 15°C

Dieser Konkurrenzversuch war bereits von Martinstetter (1967) bei 20°C Bebrütungstemperatur durchgeführt worden. In diesem Fall vermehrten sich die *Escherichien* infolge einer kürzeren Initialphase zunächst schneller und erreichten dementsprechend früher die M-Konzentration als *Aeromonas hydrophila* 43. Nach Erreichen der M-Konzentration kam es in der Konkurrenz jedoch zu einem stärkeren Absterben von *E. coli* 67/VI, wohingegen sich *Aeromonas hydrophila* 43 bis auf die in Reinkultur erreichte Endkonzentration weitervermehrte und so den konkurrierenden Partner am Versuchsende noch überwucherte.

Zur Beobachtung der wechselseitigen Wachstumsbeeinflussung bei 15°C Bebrütungstemperatur säten wir 7.500 *Aeromonaden* und 1.500 *Escherichien* in 50 ml Peptonwasser ein. Das Ergebnis dieses Konkurrenzversuches ist in Abbildung 9 wiedergegeben.

Die Kurven des *Aeromonas*-Stammes verlaufen im Kontrollversuch wie auch in der Konkurrenz gleichsinnig. *Aeromonas hydrophila* 43 vermehrte sich in 2 Tagen (48 Stunden nach der Einsaat) von 150 auf $1,5 \times 10^5$ vermehrungsfähige Einheiten pro ml und ging nach 4 Tagen (90 Stunden nach der Einsaat) mit $5,0 \times 10^6$ Einheiten pro ml in die stationäre Phase über, wobei der Wert des konkurrierenden *Aeromonas*-Stammes mit dem Kontrollwert übereinstimmte.

Die Kurve der *E. coli*-Reinkultur verläuft zunächst infolge einer längeren Initialphase flach; sie wird jedoch zu jenem Zeitpunkt steil, wo *E. coli* 67/VI in die exponentielle Wachstumsphase übergeht. Von jetzt an vermehrte sich der *E. coli*-Stamm täglich um zwei Zehnerpotenzen, was aus dem steilen Verlauf der *E. coli*-Kurve ersichtlich ist. Nach 5 Tagen (120 Stunden nach der Einsaat) wurde von der *E. coli*-Reinkultur die Endkonzentration mit

Abb. 9: Wachstumskonkurrenz zwischen *Aeromonas hydrophila* 43
und *E. coli* 67/VI bei 15°C

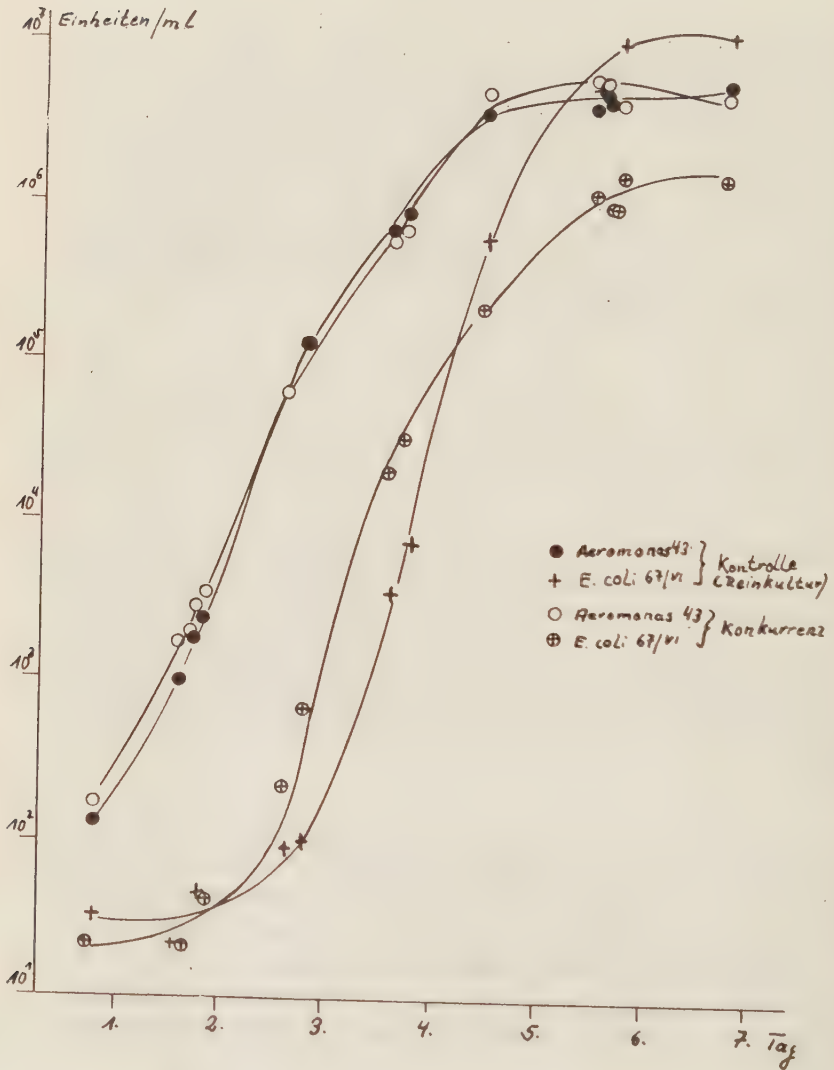
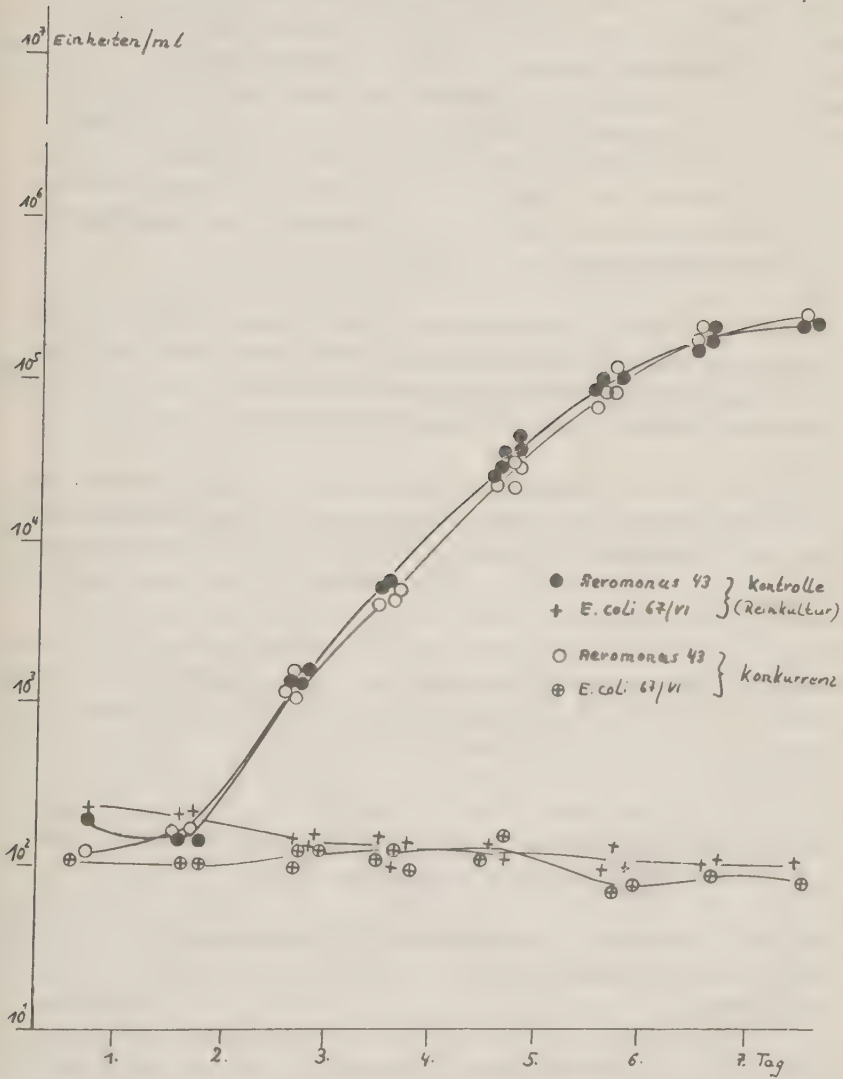


Abb. 10: Wachstumskonkurrenz zwischen *Aeromonas hydrophila* 43 und *E. coli* 67/VI bei 10°C



$9,5 \times 10^6$ Einheiten pro ml erreicht; dieser Wert liegt fast eine Zehnerpotenz über der M-Konzentration von *Aeromonas hydrophila* 43. In der Konkurrenz mit *Aeromonas hydrophila* 43 vermehrte sich der *E. coli*-Stamm zunächst schneller als seine Reinkultur (siehe Abbildung 9). Sobald *Aeromonas hydrophila* 43 jedoch die Endphase erreicht hatte, wurde *E. coli* 67/VI in der Konkurrenz unterdrückt und wir zählten nach 5 Tagen (nach 120 Stunden) nur $1,0 \times 10^6$ Einheiten pro ml. Mit diesem Zählwert lag die M-Konzentration von *E. coli* 67/VI in der Konkurrenz eine Zehnerpotenz unter der M-Konzentration der Kontrolle.

Das Ergebnis dieses Konkurrenzversuches zeigt, daß bei 15°C der *Aeromonas*-Stamm den *E. coli*-Stamm überwuchert. Dieser Effekt scheint allerdings wesentlich auf die bei 15°C längere Initialphase des *E. coli*-Stammes zurückzuführen zu sein.

Sowohl bei 20°C wie auch bei 15°C ist der *Aeromonas*-Stamm dem konkurrierenden *E. coli*-Stamm überlegen. Im ersten Fall bedingte der Absterbevorgang von *E. coli* 67/VI einen erneuten Wachstumsanstieg der *Aeromonaden*. Bei 15°C erweist sich *E. coli* 67/VI als der langsamer wachsende Stamm und unterliegt dem *Aeromonas*-Stamm in der M-Konzentration. Sobald *Aeromonas hydrophila* 43 in der Konkurrenz seine M-Konzentration erreicht hat, zwingt er den konkurrierenden *E. coli*-Stamm, mit einer niedrigeren Keimkonzentration in die stationäre Phase einzugehen.

5.2212 Wachstumskonkurrenz zwischen *Aeromonas hydrophila* 43 und *Escherichia coli* 67/VI bei 10°C

Die Untersuchung der Wachstumsgeschwindigkeit von *E. coli* 67/VI hatte bereits ergeben, daß es bei 10°C zu keiner Zellteilung mehr kommt.

Diesem Ergebnis entsprechend, blieben die Zählwerte der *E. coli*-Reinkultur während der Versuchszeit in der Größenordnung der

Einsaatmenge von etwa 200 koloniebildenden Einheiten pro ml (siehe Abbildung 10). Um das Verhalten des *E. coli*-Stammes in der Konkurrenz mit *Aeromonas hydrophila* 43 beobachten zu können, setzten wir dem Nährboden Erycin zu, wodurch der *Aeromonas*-Stamm spezifisch gehemmt wurde. Auch im Konkurrenzversuch konnte während der Versuchszeit *E. coli* 67/VI auf den Platten in der Stärke der Einsaat nachgewiesen werden.

Die Wachstumsphasen des konkurrierenden *Aeromonas*-Stammes entsprachen denen der Kontrolle; dies ist aus dem nahezu gleichsinnigen Verlauf der *Aeromonas*kurven in Abbildung 10 ersichtlich. Seiner Wachstumsgeschwindigkeit entsprechend, erreichte *Aeromonas hydrophila* 43 bei 10°C am sechsten Tag (140 Stunden nach der Einsaat) in Reinkultur wie auch in der Konkurrenz mit $5,5 \times 10^5$ koloniebildenden Einheiten pro ml die M-Konzentration.

Für den Temperaturbereich von 10°C verhalten sich die beiden *Aeromonas*-Stämme - *Aeromonas hydrophila* C₁ und *Aeromonas hydrophila* 43 - gleich, da sich der *E. coli*-Stamm bei dieser Temperatur nicht mehr vermehrt.

5.2221 Wachstumskonkurrenz zwischen *Aeromonas hydrophila* 43 und *Citrobacter freundii* RT 1/2 bei 15°C

Wir führten die Konkurrenzversuche mit dem Stamm *Citrobacter freundii* RT 1/2 durch; in der Vorarbeit hatte Martinstetter (1967) die wechselseitige Wachstumsbeeinflussung zwischen diesem Stamm und *Aeromonas hydrophila* 43 bei 20°C untersucht. Dabei hatte sich ergeben, daß die *Aeromonaden* in der Konkurrenz mit dem *Citrobacter*-Stamm bereits nach 24 Stunden nicht mehr nachgewiesen werden konnten, wohingegen die Wachstumsgeschwindigkeit des konkurrierenden *Citrobacter*-Stammes mit der Reinkultur übereinstimmte. Die *Aeromonaden* waren dem *Citrobacter*-Stamm selbst dann unterlegen, wenn sie in 20-facher Überzahl eingesät wurden.

Das Versuchsergebnis bei 15°C ist in Abbildung 11 wiedergegeben. *Citrobacter freundii* RT 1/2 vermehrte sich von Versuchsbeginn an in der Reinkultur wie auch in der Konkurrenz sehr schnell; bereits nach 2 Tagen (48 Stunden nach der Einsaat) fanden wir einen Zählwert von ca. $1,2 \times 10^6$ Einheiten pro ml in der *Citrobacter*-Reinkultur wie auch in der Konkurrenz. Am dritten Wachstumstag (nach 68 Stunden) erreichte der *Citrobacter*-Stamm die M-Konzentration mit $1,9 \times 10^7$ Einheiten pro ml. Von dem konkurrierenden *Citrobacter*-Stamm wurde dieser Wert sogar gering übertroffen.

Die beiden *Aeromonas*-Kurven verlaufen infolge einer geringeren Wachstumsgeschwindigkeit wesentlich flacher. Am zweiten Wachstumstag (44 Stunden nach der Einsaat) zählten wir in der Reinkultur wie auch in der Konkurrenz ca. $7,6 \times 10^4$ Einheiten pro ml. Am vierten Wachstumstag (84 Stunden nach der Einsaat) erreichte die *Aeromonas*-Reinkultur mit $3,5 \times 10^6$ Einheiten pro ml die Endkonzentration. Der mit dem *Citrobacter*-Stamm konkurrierende *Aeromonas*-Stamm blieb zu dem Zeitpunkt im Wachstum zurück, wo die M-Konzentration vom *Citrobacter*-Stamm in der Konkurrenz erreicht wurde. So ging *Aeromonas hydrophila* 43 bereits nach 3 Tagen (68 Stunden nach der Einsaat) im Konkurrenzversuch mit $1,8 \times 10^6$ Einheiten pro ml in die stationäre Phase über.

Übereinstimmend mit dem Ergebnis von Martinstetter wird auch in diesem Versuchsansatz eine Unterdrückung des *Aeromonas*-Stammes durch den *Citrobacter*-Stamm offensichtlich. Im Vergleich zum *Aeromonas hydrophila*-Stamm C₁ unterliegt also *Aeromonas hydrophila* 43 in der M-Konzentration, da sich dieser *Aeromonas*-Stamm im Gegensatz zu *Aeromonas hydrophila* C₁ langsamer vermehrt als der *Citrobacter*-Stamm.

5.2222 Wachstumskonkurrenz zwischen *Aeromonas hydrophila* 43
und *Citrobacter freundii* RT 1/2 bei 10°C

Um die Wachstumskonkurrenz zwischen den beiden Stämmen bei 10°C zu untersuchen, wurden von beiden Stämmen etwa 8.500 vermehrungsfähige Einheiten in 50 ml Peptonwasser inkubiert. In den ersten Versuchstagen vermehrten sich beide Stämme fast gleich schnell; wir zählten am dritten Wachstumstag (72 Stunden nach der Einsaat) ca. $1,1 \times 10^3$ Einheiten pro ml. Von jetzt an vermehrte sich der *Citrobacter*-Stamm wesentlich schneller und ging am sechsten Tag (nach 140 Stunden) mit $9,1 \times 10^6$ Einheiten pro ml in die Endphase über. Im Konkurrenzversuch fanden wir zum gleichen Zeitpunkt etwa $5,4 \times 10^6$ Einheiten pro ml vom *Citrobacter*-Stamm vor.

Demgegenüber wuchs der *Aeromonas*-Stamm langsamer und erreichte nach 7 Tagen (168 Stunden nach der Einsaat) mit $4,5 \times 10^5$ Einheiten pro ml die Endphase. Der Endwert des *Aeromonas*-Stammes in Reinkultur lag also eine Zehnerpotenz unter der M-Konzentration von *Citrobacter freundii* RT 1/2. Der mit dem *Citrobacter*-Stamm konkurrierende *Aeromonas*-Stamm blieb unter den Werten der Reinkultur; dies geht aus dem flacheren Verlauf der Kurve des konkurrierenden *Aeromonas hydrophila*-Stammes in Abbildung 12 hervor. Bereits am dritten Wachstumstag (72 Stunden nach der Einsaat) unterlag *Aeromonas hydrophila* 43 in der Konkurrenz mit $2,5 \times 10^3$ koloniebildenden Einheiten pro ml gegenüber ca. $7,5 \times 10^3$ Einheiten pro ml in der Reinkultur. Nach 7 Tagen (168 Stunden nach der Einsaat) fanden wir von *Aeromonas hydrophila* 43 in der Konkurrenz mit dem *Citrobacter*-Stamm nur $1,0 \times 10^5$ Einheiten pro ml. In der M-Konzentration wurde *Aeromonas hydrophila* 43 also um eine halbe Zehnerpotenz unterdrückt.

Der Konkurrenzversuch zwischen *Aeromonas hydrophila* 43 und *Citrobacter freundii* RT 1/2 ergibt eine Wachstumshemmung für *Aeromonas hydrophila* Stamm 43, die bei 10°C stärker ist als bei 15°C.

Abb. 11: Wachstumskonkurrenz zwischen *Aeromonas hydrophila* 43 und *Citrobacter freundii* RT 1/2 bei 15°C

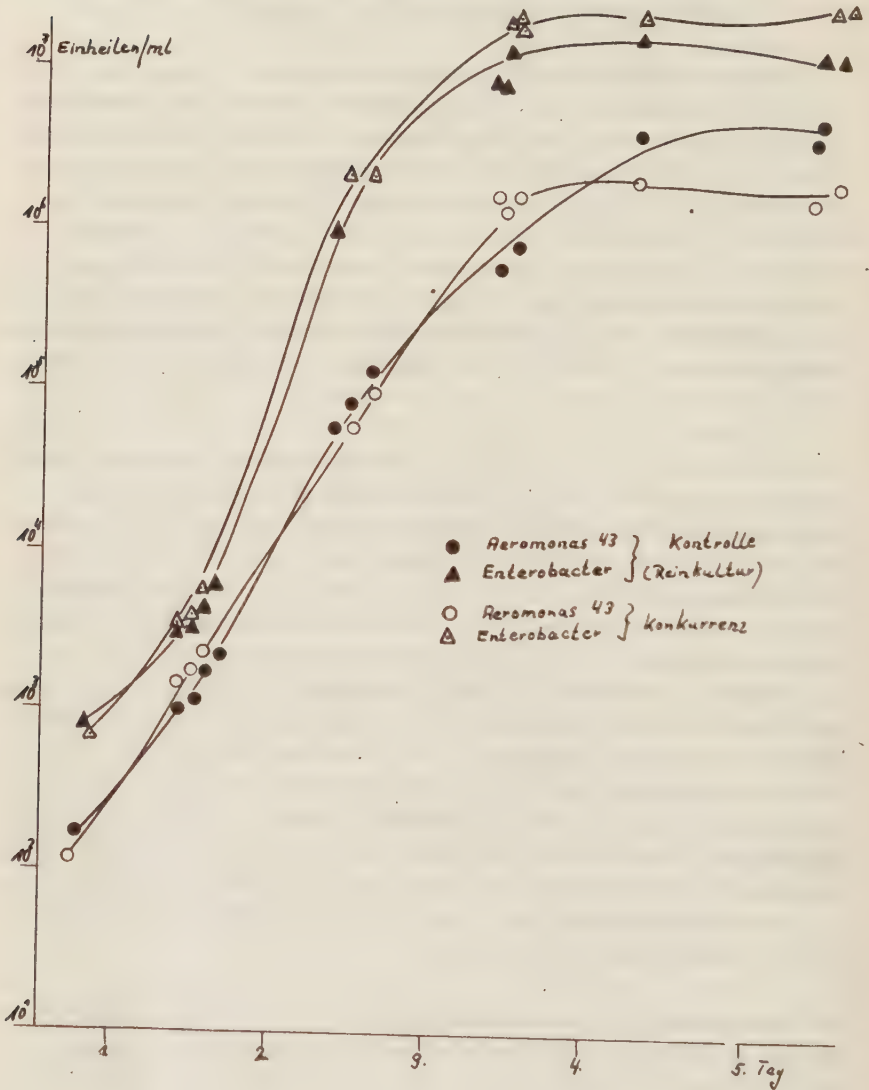
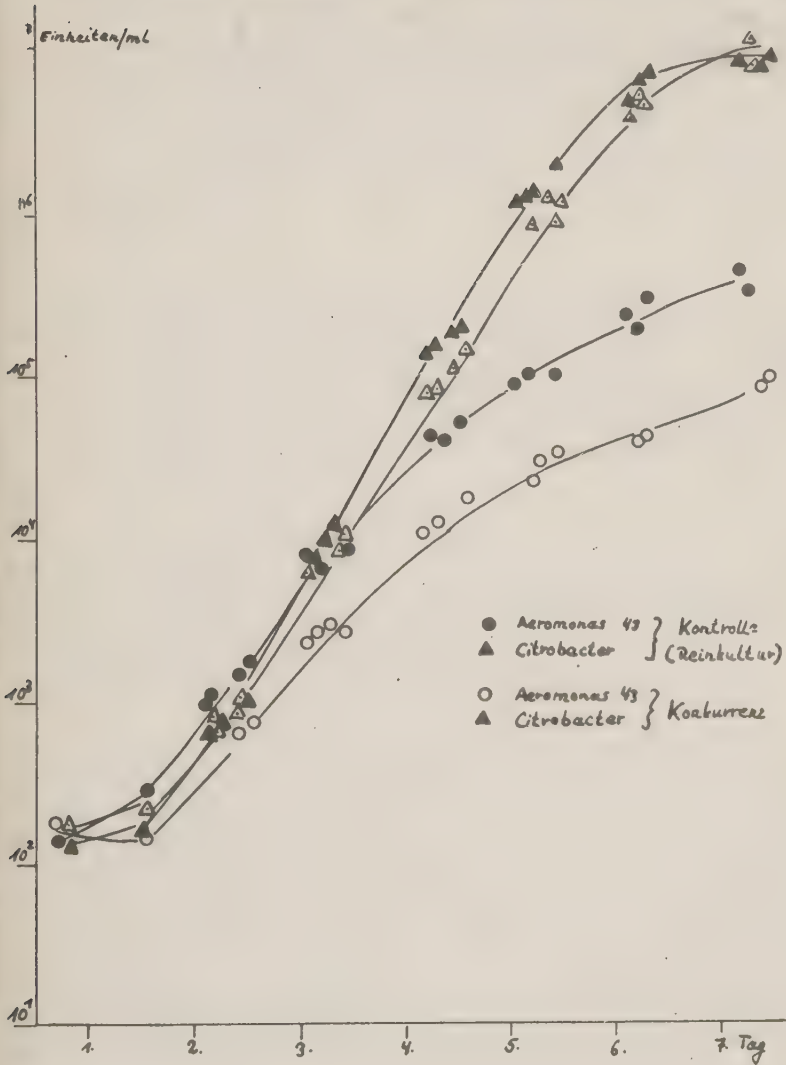


Abb. 12: Wachstumskonkurrenz zwischen *Aeromonas hydrophila* 43 und *Citrobacter freundii* RT 1/2 bei 10°C



Die Konkurrenzversuche mit *Aeromonas hydrophila* Stamm C₁ hatten in allen Fällen eine Überlegenheit des *Aeromonas*-Stammes ergeben; demgegenüber ist der *Aeromonas hydrophila*-Stamm 43 im konkurrierenden Wachstum mit *Citrobacter freundii* RT 1/2 unterlegen.

6.00 Diskussion

Aus Voruntersuchungen über die mikrobielle Besiedelung des Abwassers war bekannt, daß *Escherichia coli* und die sog. coli-formen Bakterien im Abwasser in weit geringerer Zahl zu finden sind als die *Aeromonaden* (Schubert 1967b). Die Gründe hierfür sollten in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Modellversuchen geklärt werden.

Unser Modell baut auf den Ergebnissen von Martinstetter (1967) auf; er hatte den Nährstoffgehalt den Verhältnissen im Abwasser insofern angepaßt, als bei einer Konzentration von 0,001% Pepton in Phosphat-gepuffelter Kochsalzlösung bei Wachstum von Reinkultur eine Keimzahl von 10^7 koloniebildenden Einheiten pro ml resultierte, die größenordnungsmäßig der Gesamtkeimzahl im Abwasser entspricht.

Nicht ganz den natürlichen Verhältnissen angepaßt, erscheint seine Temperatur (20°C), da diese im Abwasser nur in extremen Fällen erreicht wird. Wir wählten deshalb 10°C und 15°C als Versuchstemperatur, da die Abwassertemperatur üblicherweise - zumindest im Kanalnetz - in diesem Bereich liegt.

Unsere Untersuchungen zeigten, daß unter den verwendeten Versuchsbedingungen der Ausgang der Wachstumskonkurrenz zwischen zwei Stämmen im wesentlichen von der jeweiligen Wachstumsgeschwindigkeit abhängig ist. Die Auswirkung der unterschiedlichen Vermehrungsgeschwindigkeit ist am deutlichsten zwischen *E. coli* 67/VI und *Aeromonas hydrophila* C₁ zu sehen. Bei 15°C weist *E. coli* 67/VI von allen untersuchten Stämmen die flachste Wachstumskurve auf, während *Aeromonas hydrophila* C₁ die steilste Kurve und damit schnellstes Wachstum anzeigt. Bei 10°C zeigt *E. coli* 67/VI keine Vermehrungsfähigkeit mehr, dagegen ist die Wachstumsgeschwindigkeit von *Aeromonas hydrophila* Stamm C₁

nur geringfügig vermindert. Die anderen untersuchten Enterobacteriaceen (*Citrobacter freundii* und *Enterobacter aerogenes*) liegen bei 15°C in der Größenordnung von *Aeromonas hydrophila* C₁, zeigen jedoch bei 10°C einen stärkeren Rückgang der Wachstumsgeschwindigkeit als *Aeromonas hydrophila* Stamm C₁; deshalb unterliegen die bei 15°C dem *Aeromonas*-Stamm in der Wachstumskonkurrenz nur geringfügig nachstehenden coliformen Bakterien bei 10°C eindeutig dem Stamm *Aeromonas hydrophila* C₁.

Ferner zeigen die Wachstumskonkurrenzversuche, - insbesondere der Versuch zwischen *Aeromonas hydrophila* C₁ und *Enterobacter aerogenes* ATCC 11439 - daß der im Versuchsmodell langsamere Partner sich nur solange im Medium mit seiner normalen Geschwindigkeit vermehrt, bis der schnellere Stamm die Endkonzentration erreicht hat; danach geht auch der langsamer wachsende Keim in die stationäre Phase über.

Aus unseren Ergebnissen wird klar, daß insbesondere *Escherichia coli* den übrigen Stämmen in unserem Versuchsmilieu unterlegen ist. Dagegen stellen sich die *Aeromonaden* als die an den Temperaturbereich 10°C - 15°C am günstigsten angepaßten Bakterien heraus. Ihre Wachstumsgeschwindigkeit wird durch den Temperaturabfall weniger vermindert als es bei den Wachstumskonkurrenten *Escherichia coli* bzw. *Citrobacter freundii* und *Enterobacter aerogenes* der Fall ist.

Bei den Konkurrenzversuchen zwischen *Aeromonas hydrophila* Stamm 43 und *E. coli* 67/VI sowie *Citrobacter freundii* RT 1/2 weichen die Befunde nicht wesentlich von dem von Martinstetter bei 20°C gefundenen Verhältnissen ab. Während die mit den aus Abwasser frisch isolierten *Aeromonas hydrophila*-Stamm C₁ durchgeführten Versuche erklären, warum die *Aeromonaden* im Abwasser die Überhand über *Escherichia coli* und die coliformen Bakterien bekommen, dürfte das im Konkurrenzversuch mit den Verhältnissen im Abwasser nicht übereinstimmende Verhalten des *Aeromonas hydro-*

phila-Stammes 43 darauf zurückzuführen sein, daß es sich bei diesem Stamm um einen alten Laborstamm handelt (isoliert 1942 von Kulp und Borden), da er im Laufe der Zeit seine Eigenschaften so verändert hat, daß er dem niederen Temperaturbereich nicht mehr in der gleichen Weise angepaßt ist wie der Aeromonas-Stamm C₁.

7.00 Zusammenfassung

Zur Klärung der Frage, wie es dazu kommt, daß im Abwasser die in menschlichen Abgängen praktisch nicht vorkommenden Aeromonaden in weit größerer Zahl vorhanden sind als die mit Darminhalt in großer Menge eingebrachten Enterobakterien, wurden Versuche an einem dem Abwasser in Hinsicht auf Nährstoffgehalt und Temperatur angepaßten Modell durchgeführt. Die Versuche ergaben, daß kein Antagonismus zwischen Enterobakterien und Aeromonaden besteht, sondern daß der Ausgang der Wachstumskonkurrenz zwischen den jeweiligen Stammpaaren nur von der Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Stämme abhängig ist. Wegen der im Temperaturbereich von 10°C - 15°C für den frisch isolierten Aeromonas-Stamm C_1 bestehenden günstigen Wachstumsbedingungen, konnte dieser Aeromonas hydrophila-Stamm mit fallender Temperatur die Stämme Citrobacter freundii RT 1/2, Enterobacter aerogenes ATCC 11439 und E. coli 67/VI zunehmend überwuchern.

Der alte Laborstamm Aeromonas hydrophila 43 zeigte ein vom frisch aus Abwasser isolierten Aeromonas-Stamm C_1 abweichendes Verhalten.

Herrn Prof. Dr. med H. Habs danke ich für die Überlassung
des interessanten Themas und Herrn Priv.Do. Dr. med.
R.H.W. Schubert für die freundliche Unterstützung bei der
Anfertigung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Am 19. August 1941 wurde ich, Doris Dyckmans geb. Burghardt, als Tochter des verstorbenen Diplom-Ingenieurs Oskar Burghardt und seiner Ehefrau Anna Maria geb. Wolff in Köln geboren.

1949 zog unsere Familie nach Krefeld, wo ich von 1952 - 1961 das Städtische Neusprachliche Mädchengymnasium besuchte. Das Zeugnis der Reife erhielt ich im März 1961. Im Sommersemester 1961 begann ich das Medizinstudium an der Universität zu Köln. Nach 3 Semestern setzte ich das Studium an der Universität zu Bonn fort. Im 2. klinischen Semester studierte ich an der Universität in Wien. Im Februar 1967 bestand ich das medizinische Staatsexamen an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn. Seit Juni 1967 bin ich als Medizinalassistentin tätig.

Seit dem 22. Februar 1968 bin ich mit dem Assistenzarzt Jan Dyckmans verheiratet.

